

6 Summary

Sumarna Buonajirakul

Histopathological observation on the common carp (*Cyprinus carpio*) infected with the blood flagellate *Trypanoplasma borreli*.

Trypanoplasma borreli infects cyprinids from European waters and is widespread in hatchery populations of common carp (*Cyprinus carpio*) and tench (*Tinca tinca*). It can be associated with signs of sleeping sickness of carp. The parasite is found in the blood stream of infected fish and is transmitted by the fish-biting leeches *Piscicola geometra* and *Hemiclepsis marginata*.

In this study carp ($n = 60$) were infected with *Trypanoplasma borreli* from a cloned strain by intramuscular injection of 5000 trypanoplasms per fish. During development of infection, at days 7, 14, 18, 20, 24, and 28 post injection (p.i) of the flagellates, tissue samples for histopathological examination were taken, and the number of blood parasites and associated pathological changes were determined.

In infected fishes exophthalmos, pale gills, ascites, splenomegaly, petechial hemorrhage, and swelling of liver and kidney were found. In the gills an infiltration of trypanoplasms and inflammatory cells into the capillaries of the secondary lamellae was seen. In the heart, the ventricular and auricular muscles were infiltrated with inflammatory cells and the endocardial wall was covered by inflammatory cells. In the liver, endovasculitis was found. Liver sinusoids as well as the hepatopancreas were infiltrated with trypanoplasms and inflammatory cells. In splenic tissues an accumulation of erythrocytes and an infiltration of trypanoplasms and inflammatory cells was observed. The hematopoietic tissues of the kidney harbored masses of trypanoplasms and inflammatory cells, which caused a depression and deterioration of nephric tubules. Additionally, the glomerular capillaries were filled with trypanoplasms and inflammatory cells. Massive proliferation of lymphoid cells also was observed by in situ labeling of dividing cells with BRDU and visualization of labeled cells by immunoperoxidase staining. In the kidney of infected carp, the number of proliferating cells was increased.

Summary

throughout the experiment and in the spleen, it was significantly enhanced at days 18 and 20 p.i. In the liver, an increase proliferating cells was found at low levels only.

The pathogenic effect of *Trypanoplasma borreli* to carp, which was observed in these experiments, is likely to be caused by the deterioration of excretory nephric structures due to the massive proliferation of the renal interstitial lymphoid tissue which is considered to be a severe disturbance of osmoregulation in affected fish. This osmotic challenge in combination with an impaired gas exchange caused by an anaemia may cause death, which is often observed in *T. borreli*-infected carp.

7 *Erweiterte Zusammenfassung*

Bunnajirakul, Sumraru

Histopathologische Untersuchung an Karpfen mit einer *Trypanoplasma borreli*-Infektion

Zielsetzung

Trypanoplasma borreli ist ein Blutflagellat, der in Teichwirtschaften junge Karpfen im ersten Lebensjahr parasitiert. In der Literatur wird dieser Parasit als Erreger der Schlafsucht bei Karpfen bezeichnet, eine Erkrankung, die nach der Winterung im Frühjahr zu beobachten ist. Nach experimenteller Infektion von Karpfen im Labor entwickeln Fische aus empfänglichen Karpfenlinien eine sehr hohe Parasitämie. Die Fische zeigen Anzeichen der Schlafsucht: Exophthalmus, Ascitis, starke Anämie, moribunde Fische hängen bewegungslos an der Wasseroberfläche und sterben nachfolgend.

In der vorliegenden Studie wurden nach experimenteller Infektion von Karpfen mit *T. borreli* zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach der Inokulation Proben von Herz, Leber, Milz, Niere, Darm, Kiemen und Gehirn genommen und histologisch auf Gewebeveränderungen untersucht.

Material und Methode

Karpfen

Für alle Versuche wurden 87 SPF-Karpfen (60 infizierte, 27 Kontrollen) (*Cyprinus carpio*) verwendet, die in der Landwirtschaftlichen Fakultät der Universität Wageningen, Niederlande, produziert wurden. Die Kreuzung wurde E 20 X R 8 benannt. Die Fische wurden als befruchtete Eier aus Wageningen bezogen. Der Schlupf erfolgte wenige Tage später im Institut in Hannover. Die Fische wurden in Glasfaserbecken unter SPF-Bedingungen aufgezogen.

Trypanoplasmen

Trypanoplasma borreli LAVERAN & MESNIL, 1901 wurde aus natürlich infizierten Karpfen isoliert und kloniert (KRUSE *et al.*, 1989)

Von diesem Klon wurden Parasiten in flüssigem Stickstoff aufbewahrt und nach dem Auftauen erneut in Karpfen inokuliert. Als diese Fische eine hohe Parasitämie aufwiesen, wurde von ihnen Blut zur Infektion der Versuchsfische genommen.

Infektion mit Trypanoplasmen

Die Infektion der Versuchstiere erfolgte durch intramuskuläre Injektion von jeweils 5 000 Trypanoplasmen in 0,05 ml verdünnten Blutes. Die infizierten Fische und Kontrollfische wurden in Glasbecken gehalten.

Die Bestimmung der Parasitämie wurde den Fischen eine Blutprobe abgenommen in der Neubauer-Zählkammer die Zahl der Trypanoplasmen in dieser Probe ermittelt.

Probenbearbeitung für die Lichtmikroskopie

In etwa wöchentlichem Abstand wurden je 3 Fische getötet. Herz, Milz, Leber, Niere, Darm, Gehirn und Kiemen entnommen und in 4 %iger, phosphatgepufferter Paraformaldehydlosung fixiert. Es erfolgte im Anschluß eine stufenweise Entwässerung des Probenmaterials über eine aufsteigende Alkoholreihe. Anschließend wurde das Probenmaterial in Glycol-methacrylat eingebettet. Die Kunststoffblockchen wurden am Reichert-Jung Mikrotom geschnitten. Die Schnittstärke betrug 3-4 µm.

Die Schnitte wurden nach Giemsa gefärbt (ROMEIS, 1989) und mit einem Zeiss Photomikroskop begutachtet. Mikrophotographien wurden auf Ilford pan F Filmmaterial angefertigt.

Bromdeoxyuridin (BRDU) zur Markierung proliferierender Zellen

Zur Markierung proliferierender Zellen wurden 5 Stunden bevor die Fische getötet wurden, intraperitoneal BRDU-Lösung in einer Dosierung von 250 mg/kg Körpergewicht injiziert. Nach der Tötung erfolgte die rasche Eröffnung der Bauchhöhle, Niere, Leber und Milz wurden in 4 %iger, phosphatgepufferter Paraformaldehydlosung fixiert, entwässert und in Paraffin eingebettet. Es wurden mit einem Schlittenmikrotom Schnitte von 4 µm Dicke angefertigt und mit Eiweißglycerin auf Objektträgern fixiert. Zunächst erfolgte die Entparaffinierung der Schnittpräparate über Xylol und dann eine absteigende Alkoholreihe bis zu dest. Wasser. Eingebautes BRDU wurde immunocytochemisch in einem indirekten Verfahren nach der Immunoperoxidase-Methode sichtbar gemacht (SCHUTTEL *et al.* 1987). Im Anschluß erfolgte die Auszählung der angefärbten Zellkerne proliferierender Zellen mit dem Lichtmikroskop.

Hämatologische Untersuchungen

Direkt nach der Tötung wurden die Fische durch Abschneiden des Schwanzes entblutet. Auflaufendes Blut wurde mit Mikrohämatokritröhrchen (NH₄-heparinisiert) aufgefangen. Die bis zur Markierung mit Blut gefüllten Mikrohämatokritröhrchen wurden in einer Hämatokritzentrifuge für 5 min zentrifugiert.

Die Bestimmung der Erythrozytenzahl und der Leukocytenzahl wurden mit verdünntem und angefärbtem Blut in der Neubauer-Zählkammer vorgenommen.

Für das Differentialblutbild wurde mit dem Blut aus dem Mikrohämatokritröhrchen jeweils ein Blutausstrich angefertigt. Nach dem Lufttrocknen wurde eine Giemsa-Färbung vorgenommen (ROMEIS, 1989). Bei 1000-facher Vergrößerung wurden Leukocyten ausgezählt.

Bakteriologische Untersuchungen

Nach der Tötung erfolgte die rasche Eröffnung der Bauchhöhle, Niere, Leber und Milz wurden entnommen und auf Blutagarplatten inkuliert. Die Blutagarplatten wurden bei

Zimmertemperatur für 48 Stunden inkubiert. Subkulturen wurden von allen morphologisch unterschiedlichen Kolonien gemacht. Die Betrachtung der Morphologie, der Größe, der Formen, der Oberfläche einzelner Bakterienkolonien wurden von den Subkulturen dokumentiert.

Die Bestimmung der Bakterienarten wurde mit biochemische Untersuchungen vorgenommen.

Ergebnisse

Entwicklung der Parasiten, klinischer Befunde und Läsionen

Alle Karpfen (n = 60), denen *Trypanoplasma boreli* injiziert wurden, entwickelten eine Parasitämie. Am Anfang der Infektion wurde eine kleine Anzahl von Parasiten gefunden. Nach den Tagen 18 bis 20 p.i. stieg die Trypanoplasmenanzahl sehr rasch. Am Tag 28 p.i. wurde $75,2 \times 10^6$ Flagellaten / ml Blut ermittelt.

Klinisch waren die infizierten Fische bis zur Höhe der Parasitämie unauffällig. Die Fische zeigten normales Schwimmverhalten und fraßen gut. Am Tag 20 p.i. standen die Fische ruhig auf dem Boden des Aquariums, während sie sonst immer Fluchtbewegung zeigten. Fluchtbewegung waren nur noch bei Bedrohung auszulösen, zum Beispiel durch das Eintauchen eines Keschers in das Aquarium. Der Appetit war reduziert. Die Fische zeigten Exophthalmus, blasse Kiemen und eine Umfangsvermehrung des Abdomens. Die moribunden Fische nahmen kein Futter mehr auf. Typisch war das gestörte Schwimmverhalten. Die Fische schwammen an der Wasseroberfläche und starben. Die Bauchhöhle der schwer erkrankten und moribunden Fische (n = 3) war leicht mit einer dickflüssigen Flüssigkeit angefüllt. Außerdem wurden bei erkrankten Fischen Splenomegalie, eine Marmorierung der Milz, Petechien auf der Oberfläche der Leber, sowie eine geschwollene Niere mit Petechien beobachtet.

Hämatologische Ergebnisse

Der Hämatokrit der infizierten Fische war an den Tagen 18 bis 28 p.i. deutlich reduziert, wenn er mit den Kontrollfischen verglichen wurde.

An den Tagen 18, 23 und 28 p.i. war die Erythrozytenanzahl der erkrankten Fische im Vergleich zu den Kontrollfischen signifikant reduziert.

Die Leukozytenanzahl wurde im Verlauf der Infektion von Kontrollfischen und von infizierten Fischen ermittelt. An den Tagen 18 und 21 p.i. war die Leukozytenanzahl der infizierten Fische deutlich erhöht.

Im Differentialblutbild der infizierten Karpfen war der Anteil der Granulozyten und Monozyten an den Tagen 9 und 14 p.i. erhöht. Wenn die Parasitämie hoch war, stieg der Anteil der Retikulozyten im Blut.

Bakteriologische Befunde

Bei Kontrollfischen wurden *Aeromonas sobria* und *Vibrio* spp. gefunden. Bei infizierten Fischen wurden *A. sobria*, *Vibrio* spp. und *Bacillus subtilis* nachgewiesen. Bei Fischen, die bakteriologische Befunde aufwiesen, traten keine deutliche Veränderungen der Organe auf.

Pathologische Befunde an infizierten Geweben

In der Niere wurde am Anfang der Infektion eine geringe Infiltration von Entzündungszellen in glomerularen Kapillaren beobachtet. Wenn die Parasitämie erhöht war, vermehrte sich die Anzahl proliferierender Leukozyten, die mit BRDU nachgewiesen wurden, im hämatopoetischen Gewebe. Die Struktur von Tubuli und Glomeruli wurde durch die Infiltration der Entzündungszellen und Trypanoplasmen zerstört.

In der Milz wurden die Sinusoide mit Entzündungszellen und Trypanoplasmen infiltriert. Die Blutgefäße und das Pankreas waren ebenfalls von Entzündungszellen infiltriert und im Gewebe wurden Ansammlungen von Erythrozyten gefunden. In der Leber waren Sinusoide

und Pankreas mit Entzündungszellen und Trypanoplasmen aufgefüllt. In den Kiemen waren die Blutgefäße der Sekundärlamellen mit Trypanoplasmen und Entzündungszellen angefüllt. Im Herz wurden Ventrikel und Atrium mit Trypanoplasmen und Entzündungszellen infiltriert. Die Herzklappen waren mit Entzündungszellen bedeckt. Im Darm waren die Blutgefäße von Lamina Propria und Submukosa mit Entzündungszellen und Trypanoplasmen infiltriert. Im Gehirn waren die Blutgefäße der Meningen und des Parenchyms mit Entzündungszellen und Trypanoplasmen angefüllt.

Diskussion

In dieser Studie erwiesen sich die Karpfen als sehr empfänglich für eine Infektion mit *Trypanoplasma borreli*. Nach der Infektion entwickelten alle Fische klinische Befunde und starben. Die Empfänglichkeit der Karpfen für die Infektion wurde vor allem von der Genetik der Fische oder von dem Parasitenstamm beeinflusst (WIEGERTJES *et al.*, 1995). Der Einfluß der inokulierten Parasitenanzahl, der Temperatur oder der Körpergröße der Fische war gering (JONES *et al.*, 1993; STEINHAGEN *et al.*, 1989).

Als deutliche klinische Veränderungen traten im Laufe der Infektion eine Verminderung von Hämatokrit und Erythrozytenanzahlen, des Gehalts an Serumproteinen und der Serumosmolarität auf (LOM & DYKOVA, 1992; WOO & POYNTON, 1995). Bei sehr hoher Parasitämie wurde eine deutliche Anämie gefunden. Es wurde vermutet, daß bei anämischen Fischen der Gasaustausch reduziert war und daß sie einen Sauerstoffmangel erleiden könnten (ROBERTS, 1989).

Histopathologische Veränderungen wurden bei mit *Cryptobia salmositica* infizierten Salmoniden (WOO & POYTON, 1995), bei Goldfischen mit Trypanoplasmen-Infektion (DYKOVA & LOM, 1979; LOM *et al.*, 1986) und in der eigenen Studie untersucht. In Goldfischen wurde bei Gefäßen, die innere Organe versorgen, eine Endovaskulitis mit starker Hyperplasie der Endothelien beobachtet (DYKOVA & LOM, 1979). Die erkrankten Karpfen zeigten eine Infiltration von Entzündungszellen und Trypanoplasmen in glomerulär Kapillaren, in Lebersinusoiden und Blutgefäßen von anderen Organen, wie zum Beispiel

Herz, Darm und Gehirn. Diese Veränderungen können die Anämie verstärken und eine schwere Störung des Kreislaufs verursachen.

Die intensive Proliferation der mononuklearen Zellen in der Niere und der Milz von Karpfen mit *T. borreli*-Infektion kann als Abwehrreaktion der Fische gegen die Parasiteninfektion bewertet werden. Die Proliferation im Interstitium in der Niere wird bei Auseinandersetzung der Fische mit einer Krankheitserreger häufig beobachtet (MANNING, 1994). Die Proliferation des interstitiellen Nierengewebes verursachte eine Atrophie des exkretorischen Gewebes, was vermutlich zu einer Störung der Osmoregulation bei den infizierten Fischen führte. Diese osmotische Belastung könnte mitverantwortlich sein für die Mortalitäten, die in der Zeit vom Tag 20 bis 28 p.i. beobachtet wurden.

In der Milz wurden zu Beginn der Infektion erhöhte Proliferationen von Leukozyten gefunden. Am Tage 18 und 20 p.i. war die höchste Proliferationsrate erreicht. Bei moribunden Fischen war das Milzgewebe stark mit Trypanoplasmen infiltriert und es wurden große Ansammlungen von Erythrozyten als fokale Hämorrhagien gefunden.

Die histologische Veränderungen in der Niere von Karpfen mit *T. borreli*-Infektionen waren sehr ähnlich wie die Veränderungen, die bei Salmoniden auftreten, die an der Proliferativen Nierenerkrankung leiden. In der Niere dieser Fische wurden ebenfalls eine Hyperplasie der hämopoetischen Gewebe, vaskuläre Pathologie und diffuse entzündliche Veränderungen beobachtet (KÖRTING & SCHLOTFELDT, 1981, KENT & HEDRICK, 1986, CLIFTON-HADLEY & RICHARDS, 1987, KÖRTING *et al.*, 1989).

Die in der Niere auftretende Glomerulitis und Tubulonephritis wurde durch die intensive Proliferation des interstitiellen Nierengewebes verursacht. Diese Schädigung kann die Osmoregulation der Niere stören. Die gestörte Nierenfunktion kann zusammen mit dem durch die Anämie bedingten Sauerstoffmangel als Ursache für die schwere Erkrankung der Karpfen bei einer Infektion mit *Trypanoplasma borreli* angesehen werden.